FICHE TECHNIQUE

GELOSES POUR CONFIRMATION DES *LEGIONELLA* (BCYEα ET BCYEα SANS CYSTEINE)

CONFIRMATION DES ISOLEMENT ET DENOMBREMENT DES *LEGIONELLA*

BM07208
BM07308

1 DOMAINE D'UTILISATION

Les deux géloses pour confirmation des *Legionella,* BCYEα et BCYEα sans cystéine, sont destinées à la confirmation des colonies obtenues sur la gélose GVPC, elle-même utilisée pour les dénombrement et isolement des espèces de *Legionella* dans les eaux et les autres prélèvements susceptibles d'en contenir.

2 HISTORIQUE

- En 1977, MacDade *et al.* furent les premiers à isoler l'agent responsable de la maladie des légionnaires, une bactérie maintenant appelée *Legionella pneumophila*. Après cette découverte, de nombreuses *Legionella* ont été trouvées dans des environnements aquatiques d'eau douce : circuits de distribution d'eau, systèmes de climatisation, tours de refroidissement, eaux thermales. On dénombre actuellement 48 espèces de *Legionella*.
- En 1978, Weaver réussit à cultiver des *Legionella* sur une gélose Mueller-Hinton chocolat. Feeley *et al.* en déduisirent que la cystéine et le pyrophosphate ferrique pouvaient remplacer les suppléments vitaminés et l'hémoglobine présents dans la gélose Mueller-Hinton chocolat. Leurs travaux aboutirent à la formulation d'un milieu appelé F-G Agar. Ils déterminèrent également qu'une atmosphère enrichie à 2,5% en CO_2 était nécessaire à la culture des *Legionella*.
- En 1979, Feeley *et al.* modifièrent le milieu F-G en remplaçant l'hydrolysat de caséine par de l'extrait autolytique de levure, en ajoutant du charbon actif et en y supprimant l'amidon. Le milieu CYE obtenu permettait une meilleure croissance des *Legionella*.
- En 1980, Pasculle *et al.* ont supplémenté le milieu CYE avec un tampon ACES. Ils démontrèrent que ce milieu, dénommé BCYE, présentait une meilleure récupération des *Legionella* et pouvait être incubé en aérobiose.
- Et en 1981, Edelstein a augmenté la sensibilité du milieu en y ajoutant de l'α-cétoglutarate (milieu BCYEα). On considère comme *Legionella* toutes les colonies qui se développent sur le milieu BCYEα, mais ne cultivent pas sur le milieu BCYEα sans cystéine (BCYEα - cys).

3 PRINCIPES

- L'extrait autolytique de levure constitue le substrat nutritif permettant la croissance des *Legionella.*
- Le charbon actif décompose le peroxyde d'hydrogène (production toxique du métabolisme), capture le dioxyde de carbone et modifie la tension superficielle.
- Le maintien du pH est assuré par le tampon ACES/KOH. Sa présence permet d'incuber les milieux en aérobiose.
- La cystéine et le pyrophosphate ferrique représentent des éléments nutritifs indispensables pour la culture des *Legionella.*
- L'α-cétoglutarate est un activateur de la croissance des *Legionella*.

4 MODE D'EMPLOI

- Sélectionner au moins trois colonies caractéristiques de *Legionella* sur chacune des boîtes de milieu GVPC (**BM071**).
- Repiquer chaque colonie sur une boîte de milieu BCYEα - cys (**BM073**) et une boîte de milieu BCYEα (**BM072**).
- Incuber à 36 ± 1°C pendant au moins 2 jours.
- Considérer comme *Legionella* toutes les colonies qui se développent sur le milieu BCYEα, mais ne cultivent pas sur le milieu BCYEα - cys.
- Identifier les espèces de *Legionella* par sérologie.

Biokar Diagnostics
Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – 60002 Beauvais Cedex – France
Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

5 LECTURE

La présence de colonies sur le milieu BCYEα avec cystéine (**BM072**) et l'absence de colonies sur le milieu BCYEα sans cystéine (**BM073**) permet de conclure à la présence de *Legionella*.

Les colonies de *Legionella sp.* ont une coloration blanche à grise sur le milieu BCYEα avec cystéine (**BM072**). Elles peuvent également être bleues, roses, pourpres, marrons, vert jaune ou rouge foncé et devenir blanchâtres et/ou filamenteuses en vieillissant. Leur surface est lisse et leur bord est bien net. Elles peuvent présenter un aspect de verre pilé à la loupe binoculaire. Certaines colonies présentent une fluorescence d'un blanc brillant sous lampe de Wood. (cf ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO)

6 FORMULE-TYPE

Formule-type pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

- **Gélose BCYEα**

Pour 1 litre de milieu :

- Extrait autolytique de levure ..... 10,0 g
- Charbon actif ..... 2,0 g
- α-cétoglutarate, sel monopotassique ..... 1,0 g
- ACES (2-[(2-amino-oxoéthyl)-amino] éthanesulfonique) ..... 10,0 g
- Hydroxyde de potassium ..... 2,8 g
- Pyrophosphate ferrique ..... 0,25 g
- Agar agar bactériologique ..... 12,0 g
- L-cystéine, chlorhydrate ..... 0,4 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 6,9 ± 0,1

- **Gélose BCYEα - cys**

Pour 1 litre de milieu :

- Extrait autolytique de levure ..... 10,0 g
- Charbon actif ..... 2,0 g
- α-cétoglutarate, sel monopotassique ..... 1,0 g
- ACES (2-[(2-amino-oxoéthyl)-amino] éthanesulfonique) ..... 10,0 g
- Hydroxyde de potassium ..... 2,8 g
- Pyrophosphate ferrique ..... 0,25 g
- Agar agar bactériologique ..... 12,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 6,9 ± 0,2

7 CONTROLE QUALITE

Gélose BCYEα (BM072) / Gélose BCYEα - cys (BM073)

- Milieu préparé en boîtes : gélose noire, avec particules de charbon actif.
- Réponse culturale typique après 3 jours d'incubation à 36°C :

Microorganismes		Culture	
		Gélose BCYEα	Gélose BCYEα - cys
Legionella pneumophila	WDCM 00107	positive	négative
Escherichia coli	WDCM 00179	positive	positive

8 CONSERVATION

Milieux pré-coulés en boîtes de Petri BM072 et BM073 :

Stocker entre 2 et 8°C, à l'abri de la lumière.
Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Biokar Diagnostics
Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – 60002 Beauvais Cedex – France
Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

9 PRESENTATION

Milieux pré-coulés en boîtes de Petri (ø 90 mm) :

Gélose BCYEα - coffret de 20 boîtes.....BM07208
Gélose BCYEα sans cys - coffret de 20 boîtes.....BM07308

10 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W. et *al.* 1977. Legionnaires' disease. Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. N. Engl. J. Med., 297 : 1197-1203.

Feeley, J.C., Gorman, G.W., Weaver, R.E., Mackel, D.C., and Smith, H.W. 1978. Primary isolation media for the Legionnaires' disease bacterium. J. Clin. Microbiol., 8 : 320-325.

Weaver, R.E., and Feeley, J.C. 1979. Cultural and biochemical characterisation of legionnaires disease bacterium. 'Legionnaires', the bacterium and methodology. Center for Disease Control, Atlanta GA. p 19-25.

Feeley, J.C., Gibson, R.J., Gorman, G.W., Langford, N.C., Rasheed, J.K., Mackel, D.C. and Baine, W.B. 1979. Charcoal-yeast extract agar : primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol., 10 : 437-441.

Pasculle, A.W., Feeley, J.C., Gibson, R.J., Cordes, L.G., Myerowitz, R.L., Patton, C.M., Gorman, G.W., Carmack, C.L., Ezzell, J.W. and Dowling, J.N. 1980. Pittsburgh pneumonia agent : direct isolation from human lung tissue. J. Infect. Dis., 141 : 727-732.

Edelstein, P.H. 1981. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. J. Clin. Microbio., 14 : 298-303.

Wadowsky, R.W. and Yee, R.B. 1981. Glycine-containing selective medium for isolation of *Legionellaceae* from environmental specimens. Appl. and Environ. Microbiol., 42 : 768-772.

Dennis, P.J.L., Bartlett, C.L.R. and Wright, A.E. 1984. Comparison of isolation methods for *Legionella* spp. *In* Thornsbury, C. *et al*. (ed.) Legionella : Proceedings of the 2nd International symposium Washington D.C. Am. Soc. Micriobiol., p 294-296.

ISO 11731. 1998. Qualité de l'eau – Recherche et dénombrement des *Legionella*.

NF EN ISO 11731-2 (T 90-430). Juillet 2008. Qualité de l'eau. Recherche et dénombrement des *Legionella*. Partie 2 : Méthode par filtration directe sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries.

11 AUTRES INFORMATIONS

Les mentions portées sur l'étiquette sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document et susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.

Code document : BM072/F/2012-05 : 1.
Date de création : 05-2012

Biokar Diagnostics
Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – 60002 Beauvais Cedex – France
Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO

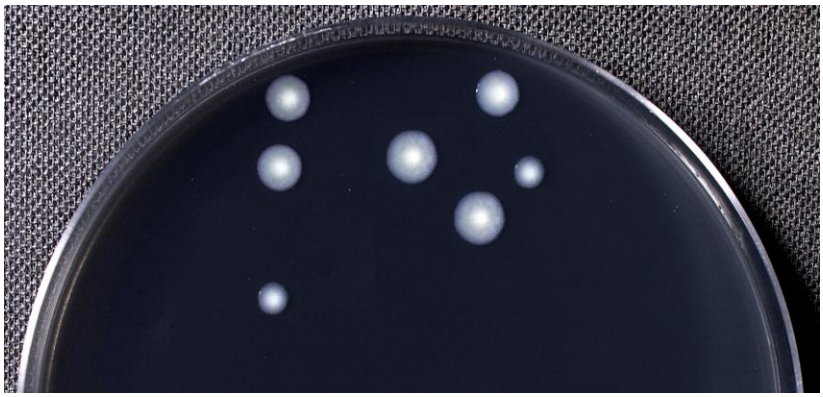
GELOSES POUR CONFIRMATION DES *LEGIONELLA* BCYEα ET BCYEα SANS CYSTEINE

Méthodologie :

- Repiquage de 3 colonies caractéristiques de *Legionella* du milieu GVPC sur les milieux BCYEα (**BM072**) et BCYEα - cys (**BM073**)
- Incubation à 36 ± 1°C pendant 2 jours.

Lecture :

Croissance obtenue sur les géloses BCYEα et BCYEα - cys après 2 jours d'incubations à 36°C.



Legionella pneumophila sur gélose BCYEα

Microorganismes	Colonies caractéristiques sur gélose BCYEα	Colonies caractéristiques sur gélose BCYEα - cys
Legionella	Blanches à grises avec une surface lisse, pouvant présenter un aspect de verre pilé à la loupe binoculaire.	Absence de colonie

Codes produit:

BM07208 : Gélose BCYEα - coffret de 20 boîtes
BM07308 : Gélose BCYEα sans cys - coffret de 20 boîtes

Biokar Diagnostics
Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – 60002 Beauvais Cedex – France
Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr